J. sci. pharm. biol., Vol.10, n°1 - 2009, pp.58-63

KIPRE GUEYRAUD R.[1]
OUATTARA L.[1*]
FOFANA BEN I.[1]
GRELLIER P.[3]
GUEDE-GUINA F.[1]
DJAMAN J.[1,2]

ETUDE COMPAREE DE LA CULTURE *IN VITRO* DE SOUCHES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* SUR MILIEU CONTENANT DU SERUM HUMAIN NON DECOMPLEMENTE ET DECOMPLEMENTE

RESUME

Plasmodium falciparum, le parasite responsable du paludisme mortel de l'homme, est une cause majeure de morbidité et de mortalité dans tout le monde tropical. La culture *in vitro* du *Plasmodium* demeure l'une des méthodes indispensables pour la détermination du phénotype résistant et de la surveillance de l'efficacité d'un antipaludique. La culture de *Plasmodium falciparum* nécessite un milieu de culture, le RPMI 1640 (Roosvelt Park Medium Institute), dont l'efficacité est liée à l'addition de sérum humain. Il est donc nécessaire que les pays du sud puissent la pratiquer dans leur laboratoire.

Dans ce travail, le sérum humain décomplémenté utilisé comme sérum de référence (SR) additionné au RPMI 1640 est comparé au sérum humain non décomplémenté (SND) au cours de la culture *in vitro*. Ensuite, l'évaluation de la sensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum* à la pyriméthamine est étudiée en fonction du type de sérum (SR ou SND) contenu dans le milieu de culture.

Les résultats obtenus montrent un taux de maturation plasmodiale supérieur à 20% (seuil inférieur de validité selon l'OMS). Ainsi, le taux de maturation des souches de laboratoire était de 83% avec FCB1, 75% avec PFB et 90% avec K1 lorsque le milieu de culture contient le SR. Il était de 77%, 75%, et 90% respectivement avec FCB1, PFB et K1, quand le milieu de culture contient le SND.

Quant au test de chimiosensibilité *in vitro* à la pyriméthamine, les CI_{50} obtenues avec le SND permettent de conserver les mêmes sensibilités des souches, CI_{50} < 2000 nM souches sensibles (FCB1 et PFB) et CI_{50} > 2000 nM souches résistantes (K1), que le SR.

Mots-clés : Culture *in vitro*, Sérum humain, Complément, *Plasmodium* .

1- Laboratoire de Pharmacodynamie-biochimique, UFR Biosciences, Université de Cocody, 22 BP 582 Abidjan 22
2-Laboratoire de biochimie, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Bp V 490 Abidjan
3-USM 0504"Biologie fonctionnelle des protozoaires" EA 3335 Département "Régulation, Développement, Diversité Moléculaire" Muséum National d'Histoire Naturelle, Case Postale 52. 61 rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France
*Correspondance à Ouattara Lacinan, 14 Bp 1382 Abidjan 14 / olacinan@yahoo.fr

SUMMARY

Comparative study of an in vitro culture of Plasmodium falciparum stubs on medium containing human serum with Plasmodium antibodies and human serum without Plasmodium antibodies

Plasmodium falciparum, the liable parasite for the mortal malaria, is the major cause of mortality and morbidity in tropical Africa.

The in vitro culture of Plasmodium remains one of essential methods for the determination of the proof phenotype and the surveillance of antimalarial drugs efficacy. The culture of Plasmodium falciparum requires a medium, RPMI 1640, of which the efficacy runs on to the addition of human serum. . It is therefore necessary to have a serum of good quality and at a lower cost in order to practice this technique in our laboratories.

In this work, the human serum of reference (SR) added to the RPMI 1640 is compared with the human serum containing Plasmodium antibodies (SND) during the in vitro culture.

After, the valuation of the sensitiveness in vitro of Plasmodium falciparum to the pyriméthamine is studied acting of the type of serum (SR or SND) contained in the middle of culture.

Our tests were carried out three laboratory strains namely K1, FCB1 and PFB. These strains stored in nitrogen and thawed liquidated maintained in culture in the RPS (RPMI containing 10% of washing of human serum) in an oven set at 37 °C of carbon dioxide and humidity of 95% during 42 hours in candle jar.

The results obtained, show a rate of plasmodial maturation higher than 20% (lower threshold of availability according to WHO). Thus, the rate of maturation on laboratory stubs is 83% with FCB1, 75% with PFB and 90% with K1 when the medium contains SR. It varies from 77%, 75%, and 90% respectively with FCB1, PFB and K1, when the medium contains SND.

As for the test of in vitro chemosensitivity to the pyriméthamine, the given IC_{50} *make it possible to obtain the same sensitive* ($IC_{50} < 100$ *nM, FCB1 and PFB) and resistant* ($IC_{50} > 2000$ *nM, K1) laboratory stubs, as well with SR with SND.*

Key words : *In vitro* culture, human serum, Supplement, *Plasmodium*

INTRODUCTION

Le paludisme demeure l'une des maladies parasitaires les plus fréquentes dans le monde et probablement l'une des plus meurtrières de toutes les affections humaines. En Afrique subsaharienne, on dénombre plus de 220 millions de cas avec près de 1 million de morts par an dont 75% sont les enfants de moins de 5 ans [Snow 1999, OMS 2005].

Malgré les efforts massifs pour contrôler le paludisme, le pourcentage de morbidité et de mortalité n'a pas changé de manière significative ces 50 dernières années [Greenwood 2004].

Dans la lutte contre cette parasitose, l'étude *in vitro* permet d'évaluer la sensibilité intrinsèque des parasites aux antipaludiques et de caractériser au plan épidémiologique la nature des isolats de *Plasmodium* circulant dans une zone donnée [Guigemde 1996]. Cette étude donne la possibilité de mesurer l'efficacité d'un antipaludique sans que n'interviennent les facteurs d'interférences dans la multiplication des parasites telle que l'immunité de l'hôte [Rieckmann 1971].

La culture de *Plasmodium falciparum* nécessite un milieu de culture, le RPMI 1640, dont l'efficacité est liée à l'addition de

sérum humain soit dépourvu d'anticorps antiplasmodiaux, soit décomplémenté lorsque le sérum provient de sujets vivant en zone d'endémie palustre [WHO 1982, Schlichtherle 2000]. En effet, la présence d'anticorps antiplasmodiaux, tout comme les leucocytes dans le sang ajoute ses effets schizonticides à ceux du médicament étudié *in vitro*. La croissance des plasmodies est alors impossible par suite d'inhibition des jeunes trophozoïtes [Danis 1991].

Si le premier type de sérum (dépourvu d'anticorps) est difficilement accessible à cause de son coût élevé, le deuxième type de sérum (décomplémenté) nécessite un travail fastidieux de décomplémentation et de stérilisation sur filtre millipore lui-même onéreux pour la bourse des chercheurs du sud.

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'efficacité du sérum humain non-décomplémenté dans la culture *in vitro* de souches de *P. falciparum*.

MATERIELS ET METHODES

1. MATERIEL BIOLOGIQUE ET MILIEU DE CULTURE

Trois souches de *P. falciparum* dont deux (PFB et FCB1) résistantes à la chloroquine mais sensible à la pyriméthamine et une (K1) résistante à la fois à la chloroquine et à la pyriméthamine ainsi que des globules rouges sains du groupe O^+ ont servi de matériels biologiques. Ces hématies saines ont servi pour la dilution du sang parasité lorsque la densité parasitaire était supérieure à 8000 parasites asexués par microlitre de sang.

Le RPMI 1640 contenant de l'HEPES 25 mM et du bicarbonate de sodium (NaHCO3) 25 mM a été utilisé comme milieu de culture pour les souches de *P. falciparum*. L'HEPES et le NaHCO3 jouent un rôle de double tampon et maintiennent le milieu de culture à un pH compris entre 7,2 et 7,4 [WHO 1982]. A ce milieu de culture, il a été ajouté 10% de sérum humain du groupe O^+ soit décomplémenté soit non décomplémenté.

2. MISE EN CULTURE DE L'INOCULUM (SANG PARASITÉ + RPMI CONTENANT LE SÉRUM)

Les souches PFB, FCB1 et K1 conservées dans l'azote liquide ont été décongelées et maintenues en culture dans le RPS (RPMI 1640 contenant 10% de sérum humain dépourvu d'anticorps) pendant quelques jours afin d'obtenir une bonne densité parasitaire. Avant la culture en présence d'antipaludique, on a réalisé une synchronisation de la culture par un traitement du sang parasité par du sorbitol à 5% afin d'obtenir uniquement des parasites au stade jeunes («ring») pour les tests [Lambros 1979]. Le sang a été ensuite dilué si nécessaire par des globules rouges non parasités préalablement lavés.

Dans la première partie du travail les souches ont été maintenues en culture (incubation) dans le RPS (RPMI contenant 10% de sérum humain) dans une étuve réglée à 37°C en présence de gaz carbonique et 95% d'humidité pendant 42 heures [Le Bras 1983, Le Bras 1983] dans une jarre à bougie. Le sérum humain ajouté a été soit décomplémenté servant de référence (SR) soit non décomplémenté (SND). La décomplémentation a été faite dans un bain-marie à 50°C pendant au moins 45 minutes [Schlichtherle 2000] suivie d'une stérilisation sur filtre millipore. Ainsi, deux tubes contenant le même sérum dont le premier a été décomplémenté et le deuxième non décomplémenté (SND) furent préparés pour réaliser les tests de maturation *in vitro* dans les mêmes conditions.

La vérification de la maturation a été faite après 42 heures d'incubation par le comptage du nombre de schizontes pour 200 parasites asexués, après lecture des gouttes épaisses réalisées à partir des cultures en absence d'antipaludique.

La deuxième partie de ce travail a été consacrée au test de chimiosensibilité à la pyriméthamine en utilisant le SR parallèlement au SND pour vérifier la sensibilité des souches à la pyriméthamine.

C'est la variante isotopique du microtest OMS [Rieckmann 1978] qui a été utilisée dans ce travail. Elle mesure la capacité de doses croissantes d'un antipaludique à inhiber la croissance de *Plasmodium* dans un milieu de culture (RPMI contenant du sérum humain). Après 42 heures d'incubation, l'ADN a été recueilli après lavage sur un papier de fibre de verre à l'aide d'un collecteur cellulaire, puis, la quantité d'hypoxanthine incorporée par les parasites a été mesurée par un compteur à scintillation liquide (WALLAC, 1450 Microbeta TRILUX) en coup par minute.

Une droite de régression tracée par un programme à partir de ces valeurs a permis de déterminer la CI_{50} de chaque produit sur les deux souches pour chaque type de sérum.

RESULTATS

Le sérum humain référentiel ajouté au RPMI 1640 de lavage a permis d'obtenir des taux de maturation de trophozoïtes de *P. falciparum* en schizontes supérieurs à 20% (taux de maturation référentiel pour valider la culture *in vitro*) et ce, quelque soit la souche plasmodiale. Cette maturation est de 83% pour FCB1, 75% pour PFB et 90% pour K1. Lorsque le sérum n'était pas décomplémenté (SND, essai), le taux de maturation était de 77% pour FCB1, 70% pour PFB et de 80% pour K1 (figure 1).

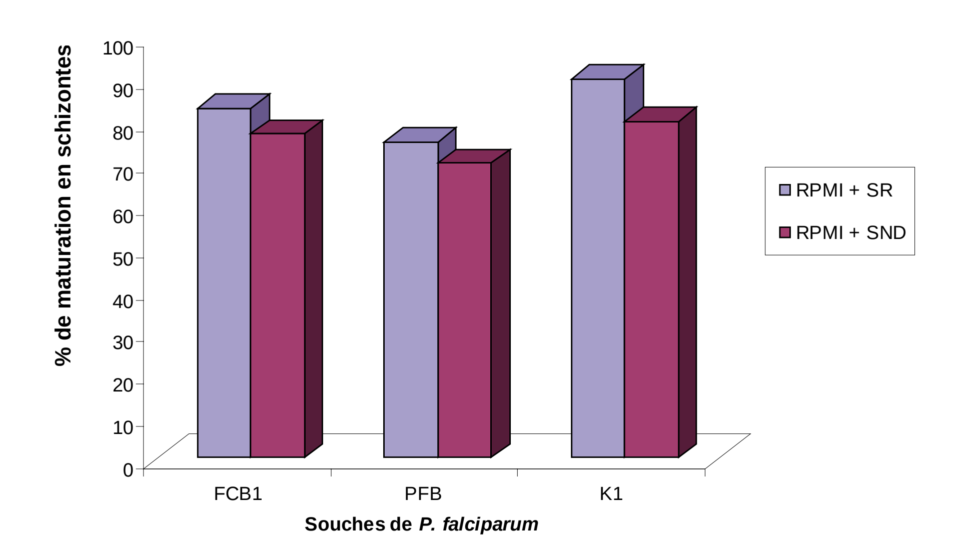


Figure 1 : Taux de maturation en schizontes de *P. falciparum* en fonction de la souche plasmodiale et de sérum.

Les résultats obtenus dans les tests de chimiosensibilité *in vitro* des souches dans un milieu contenant du sérum non décomplémenté avoisinaient ceux obtenus avec le sérum de référence. Les CI_{50} moyennes de la pyriméthamine étaient respectivement de 253.60 ± 52.75, 48.94 ± 1.34 et 4876.8 ± 562.57 nM pour les souches FCB1, PFB et K1 sur SR. Ces CI_{50} moyennes étaient de 210.58 ± 29.69, 48.29 ± 0.04 et 4877 ± 216.37 nM sur SND (tableau I).

Tableau I : Sensibilité *in vitro* à la pyriméthamine des souches de *P. falciparum* selon le sérum ajouté au milieu de culture (RPMI 1640)

	CI_{50} en nM de la pyriméthamine (n = 3)	
Souches Plasmodiales	**Sérum décomplémenté (SR)**	**Sérum non décomplémenté (SND)**
FCB1	**253,31 ± 52,75**	**210,58 ± 29,69**
PFB	**48,94 ± 1,34**	**48,29 ± 0,04**
K1	**4876,8 ± 52,57**	**4804,75 ± 216,37**

DISCUSSION

Le taux référentiel de croissance des jeunes trophozoïtes en schizontes indiqué par l'OMS pour valider un test de chimiosensibilité et déterminer ensuite l'activité antiplasmodiale d'une substance est de 20% [Schlichtherle 2000].

Au vu des résultats obtenus avec le SND (77% pour FCB1, 70% pour PFB et 80% pour K1), il ressort que le sérum non décomplémenté ne présente pas de risque d'inhibition de la maturation des plasmodies en culture *in vitro*. Il permet d'obtenir des résultats aussi satisfaisants que le SR suggéré et utilisé jusqu'alors au cours de l'évaluation *in vitro* de la chimiosensibilité de *P. falciparum*. L'intérêt de cette étude était d'avoir obtenu au moins 20% de schizontes dans les cultures sans antipaludique et sans hypoxanthine qui nous ont servi de témoins afin de lancer nos tests isotopiques et de déterminer la CI_{50} des souches vis-à-vis de la pyriméthamine sur milieu contenant du SND.

En effet, si certains auteurs ont démontré le rôle déterminant des anticorps antiplasmodiaux dans l'immunité contre les formes sanguines asexuées de *P. falciparum* [Danis 1991], de nombreux travaux ont tenté de déterminer le mode d'action de ces anticorps [Bruce-Chwatt 1984]. Il a été mis en évidence à la surface des globules rouges parasités par *P. falciparum*, un antigène spécifique appelé antigène HRP2 (Histidine Rich Protein 2) [Martet 2000] qui est une glycoprotéine avec le galactose comme sucre. La reconnaissance de cette protéine par les anticorps antiplasmodiaux permet de former un complexe qui exerce une action destructrice sur le *Plasmodium* à l'intérieur du globule rouge. La série de lavage (trois fois) entreprise suivie de centrifugations puis de l'élimination de la couche leuco-plaquettaire avant la mise en culture des parasites, a pour but d'éliminer les protéines HRP2 présentes à la surface des hématies parasitées et nécessaires à la fixation des anticorps et à la formation du complexe anticorps-anti-HRP2. A la fin de ce lavage, nous obtenons des globules rouges dépourvus ou faiblement pourvus de protéines HRP2; dès lors le *Plasmodium* peut subir une maturation par division mitotique de son noyau et atteindre le stade schizontes (stade à plusieurs noyaux).

Ces résultats sont en accord avec les tests de Djaman [2002], qui a obtenu des résultats similaires avec des isolats de la nature et une même sensibilité avec la chloroquine.

CONCLUSION

Il est possible aujourd'hui avec le sérum non décomplémenté (SND) de réaliser un test de chimiosensibilité et de réaliser les cultures *in vitro* de *P. falciparum*. Face au paludisme qui touche particulièrement l'Afrique subsaharienne [WHO 1998], l'utilisation SND additionné au RPMI permettra aux laboratoires du sud de réaliser une surveillance des souches de *P. falciparum* circulant dans leur pays. Il est également possible de mesurer la sensibilité de ces souches par rapport aux antipaludiques usuels et pour permettre le criblage systématique de nouvelles substances antipaludiques comme celles issues de la pharmacopée traditionnelle africaine [O'Neil 1980, Phillipson 1986].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1- Bruce-Chwatt L, Black RH, Canfield DCJ, Clyde DF, Peters W et Wernsdorfer WH. (1984) Rôle de l'immunité dans la chimiothérapie du paludisme in chimiothérapie du paludisme 2ème éd., OMS. 274 p.

2- Danis M et Mouchet J. (1991) La réponse immune de l'hôte, l'adaptation du parasite et chimiorésistance des *Plasmodiums* in Paludisme. éd., marketing : ellipses. 240 p.

3- Djaman AJ, Coulibaly PA et Guédé-Guina F. (2002) Culture in vitro d'isolats de *P. falciparum* sur milieu contenant du sérum humain non décomplétementé. *Rev Iv Sci Tech* ; 3 : 119-26.

4- Guiguemde TR, Gbary AR, Coulibaly CO et Ouedraogo JB. (1996) Comment réaliser et interpréter les résultats d'une épreuve de chimiorésistance de *P. falciparum* chez les sujets malades en zone tropicale. *Santé* ; 6 : 187-91.

5- Greenwood B. (2004) Malaria : between hope and hard place. *Nature* ; 3 : 418-20.

6- Lambros C et Vanderberg JP. (1979) Synchronization of *Plasmodium. falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* ; 3 : 418-20.

7- Le Bras J et Deloron P. (1983) *In vitro* study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* an evaluation of a new semi microtest, *Am J Trop Med Hyg*; 32 : 447-51.

8- Le Bras J, Deloron P, Ricour A, Andrieu B, Savel J et Coulaud JP. (1983) *Plasmodium falciparum* : drug sensitivity in vitro of isolates before and after adaptation to continuous culture, *Exp Parasitol* ; 56 : 9-14.

9- Martet G et Peyron F. (2000) Généralités, les outils du diagnostic in diagnostic du paludisme, 22p.

10- O'Neil JM, Bray DH, Boardman P et Phillipson D. (1986) Plants as sources of antimalarial drugs : *in vitro* antimalarial activities of some quassinoids. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy ;* 30 : 101-4.

11- OMS 2005. Le rapport mondial sur le paludisme : Brienfing de 5 min sur le rapport mondial 2005 de l'OMS et de l'UNICEF sur le paludisme. 5 p.

12- Phillipson D et O'Neil JM. (1986) Novel antimalarial drug from plants ? *Parasitology Today* ; 2 : 355-58.

13- Rieckmann KH, Campbel GH, Sax LJ et Mrema JE. (1978) Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. *Lancet* ; i : 22-3.

14- Rieckmann KH et Lopes-Antunamo FJ. (1971) Mode d'emploi du nécessaire d'épreuve pour l'évaluation de la réponse de *P. falciparum* à la chloroquine *in vitro*. *Bull Org Mond Santé* ; 45 : 157-67.

15- Schlichtherle M, Wahlgren M, Perlmann H et Scherf A. (2000) Methods in malaria research third. MR4/ATCC éd., Manassas, Virginia. 77 p.

16- Snow RW, Craig M, Daichmann U et Marsh K. (1999) Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bull World Healf Organ* ; 77 : 620-40.

17- WHO 1998. Paludisme, aide mémoire révisé n°4, 6p.

18- WHO 1982. Mode d'emploi du nécessaire d'épreuve pour l'évaluation de la réponse de *P. falciparum* à la chloroquine et à la méfloquine *in vitro*, MAP/82, 9p.